

平成 28 年 4 月 21 日現在

機関番号：17102

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2011～2015

課題番号：23119002

研究課題名（和文）細胞応答制御のための人工遺伝子回路の開発

研究課題名（英文）Construction of synthetic genetic circuit for control of cell response

研究代表者

花井 泰三（Taizo, Hanai）

九州大学・（連合）農学研究科（研究院）・准教授

研究者番号：60283397

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 144,300,000 円

研究成果の概要（和文）：本計画研究班の研究目的は、生体分子10要素以下の少数要素で構成され、望みの動的挙動を実現するための人工遺伝子回路を生体内（in vivo）に構築することである。そのため、安定動作する遺伝子トグルスイッチの構築、遺伝子トグルスイッチの応用研究、センサータンパク質の改良、クオラムセンシングの再構成と改良を行った。特に回路の設計および結果の解析については、コンピュータシミュレーションも利用した。これら研究を通じて、最終的には、細胞密度・栄養源・生産物などを感知し、自ら制御を行い、物質を生産する「自律制御物質生産微生物」を構築した。

研究成果の概要（英文）：The goal of this research project is to construct the synthetic genetic circuit which realizes a desired dynamic behavior. This circuit is composed of 10 or less biological molecular parts. In order to reach this goal, we accomplished 1) construction of genetic toggle switch operating with high stability, 2) application of genetic toggle switch, 3) modification of sensor proteins, 4) reconstruction and modification of quorum sensing system. We used not only molecular biology but also mathematical analysis for the system design of the synthetic genetic circuit. Through these researches, at last, we succeeded to construct "target product producing microorganism autonomously controlled" which could sense cell number and change intracellular metabolite distribution suitable for from cell growth to production according to cell number and produce 3 times more target product than the control strain.

研究分野：合成生物学

キーワード：合成生物学 シミュレーション トグルスイッチ 人工遺伝子回路 合成代謝経路 2成分制御系 クオラムセンシング

1. 研究開始当初の背景

合成生物学の具体的なゴールは、サイエンスの分野では、特定の生命現象を、同定済みの生体分子を利用して再構築し、詳細に解析する「人工遺伝子回路」の構築や、少数遺伝子の破壊や過剰発現といった従来手法とは異なる人為的な変化を生体分子ネットワークに加えることで未知の相互作用を理解することだと考えている。また、エンジニアリングの分野では、環境をセンシングし、自ら最適な制御を自律的に行う細胞をつくることであると考えている。いずれのゴールにも、刺激に応答し、時間経過とともに望みの遺伝子に望みの発現軌跡をたどらせる必要がある。しかし、このような「動的(時間経過で変動する)な遺伝子発現のコントロール」のためには、環境をモニターする仕組み、複数種類の mRNA やタンパク質の合成・分解速度、それら複数要素によるレギュレーションなどが複雑に絡み合うことから、多くの困難が伴う。このような状況から、研究開始当初のみならず現在でも、世界的に見て、上記のような合成生物学の研究においては、小規模な人工遺伝子回路および特定の物質を生産するための合成代謝経路についての報告があるのみである。

2. 研究の目的

このような背景に基づいて、本計画研究班の研究目的は、生体分子 10 要素以下の少数要素で構成され、望みの動的挙動を実現するための人工遺伝子回路を生体内 (*in vivo*) に構築することとした。具体的には、安定動作する遺伝子トグルスイッチの構築、遺伝子トグルスイッチの応用研究、センサータンパク質の改良、クオラムセンシングの再構成と改良を行う。これらの研究には、分子生物学、培養工学による実験のみならず、特に回路の設計および結果の解析については、コンピュータシミュレーションを利用する。また、この研究を通じて、最終的には、細胞密度・栄養源・生産物などを感知し、自ら制御を行い、物質を生産する「自律制御物質生産微生物」を構築する。この他に、同じ領域内の公募研究班および計画研究班との共同研究を進める。

3. 研究の方法

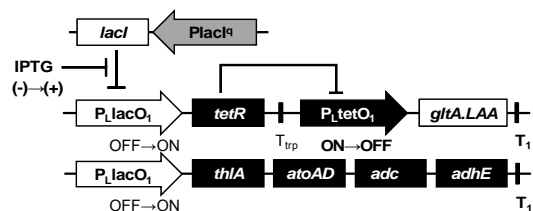
安定動作する遺伝子トグルスイッチ

我々は、すでに、恒常的に発現するリプレッサー LacI によって発現抑制された pLlacO1 プロモーターの下流に、pLtetO1 プロモーターのリプレッサーである *tetR* を挿入した遺伝子トグルスイッチを作成しており、pLlacO1 あるいは pLtetO1 の下流にレポーター遺伝子 *gfpmut3.1* を導入することで、その動作を確認済みである。しかし、誘導剤 IPTG 添加によって、pLtetO1 下流のレポーターの生産は速やかに停止 (OFF) するが、pLlacO1 下流のレポーターの生産は一時的に行われる (ON)

ものの、すぐに生産量が低下した。このことが、この遺伝子トグルスイッチの応用研究に大きな問題となっていたため、この遺伝子トグルスイッチの改良を試みた。

遺伝子トグルスイッチの応用研究

この研究で構築した遺伝子トグルスイッチを、バイオプラスチック材料として注目されているイソプロパノールを生産する大腸菌の代謝制御に応用することとした。大腸菌によるイソプロパノール生産では、大腸菌内のアセチル CoA を消費して、4 つの外来酵素遺伝子からなる合成代謝経路により、生産が行われる。アセチル CoA は、細胞増殖で重要な TCA サイクルで消費される中間代謝物であるが、細胞増殖後でも大量に TCA サイクルで消費される。つまり、TCA サイクルとイソプロパノール生産合成代謝経路では、アセチル CoA を奪い合う競合関係にある。アセチル CoA は、クエン酸シターゼによって TCA サイクルに取り込まれているため、大腸菌のクエン酸シターゼ遺伝子 (*gltA*) をノックアウトすれば、アセチル CoA のほとんどはイソプロパノールの生産に利用され、大腸菌一つあたりのイソプロパノールの生産量を増やすことができる。しかし、この場合、TCA サイクルが停止するため、菌体増殖することができず、結果的に生産量は低くなってしまう。このため、*gltA* ノックアウト大腸菌に、pLtetO1 下流に *gltA* に導入した遺伝子トグルスイッチと pLlacO1 で発現制御したイソプロパノール生産合成代謝経路を導入することとした(下図)。この株は、IPTG 添加前は *gltA* が発現することで菌体増殖し、十分な細胞増殖後に IPTG を添加すれば、*gltA* の発現が抑制され TCA サイクルでのアセチル CoA の消費も抑制されることとなる。結果として、発現したイソプロパノール合成代謝経路遺伝子によるイソプロパノール生産量の向上が期待できる。



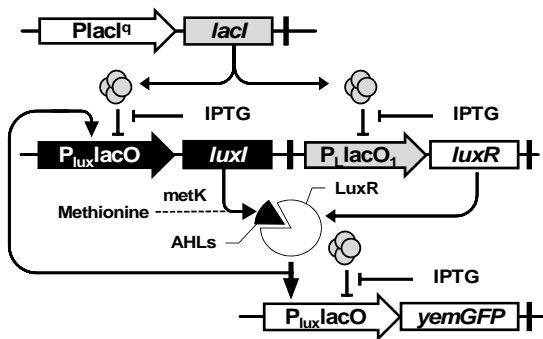
センサータンパク質の改良

大腸菌において遺伝子発現を光の波長によって人為的に ON/OFF できるスイッチを開発するため、シアノバクテリア (*Nostoc punctiforme*) 由来の 2 成分制御系 CcaS/CcaR、および CcaS に結合する発色団フィコシアノピリンを大腸菌内に発現させる。この大腸菌に、レスポンスレギュレーター CcaR の転写活性によって活性化するプロモーターを用いることで、緑色光下で ON、赤色光下で OFF となる光応答性の大腸菌の構築が期待でき

る。さらに、大腸菌由来のヒスチジinkinナーゼに光応答性を付与することを目指して、各種キメラヒスチジinkinナーゼを作成した。

クオラムセンシングの再構成と改良

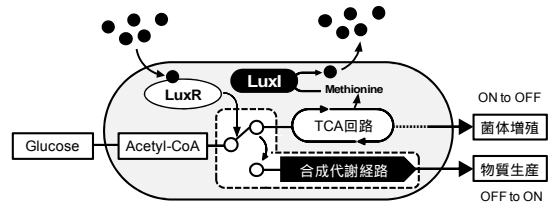
菌体密度を感知して、自律的な制御を行う大腸菌を構築するため、クオラムセンシング(QS)機構の再構成と改良を行った。QSは、微生物が互いの菌体密度を感知して相互に遺伝子発現を制御し合うシステムである。我々は、最も研究されたQSの1つである*Vibrio fischeri*由来のLuxシステムを大腸菌内で再構成することとした。Luxシステムでは、LuxIによって合成させる自己誘導剤アシルモホセリンラクトン(AHL)が細胞間を拡散し、転写調節因子LuxRと結合する。このAHL-LuxR複合体がpluxプロモーターを活性化することで、下流の遺伝子発現が誘導される。培養液中のAHL濃度は菌体増殖とともに増加し、その濃度がある閾値に達すると特定遺伝子が発現する。AHL合成遺伝子であるluxIはpluxプロモーター制御下にあり、ポジティブフィードバックでその発現が促進される。ただし、Luxシステムを大腸菌内に構築しただけでは、非常に低く、決まった菌体密度でしか動作しない回路となることが知られており、物質生産で利用される高密度菌体では利用できない。そこで、QSにより遺伝子発現が誘導される菌体密度(閾値菌体密度)をもっと高い菌体密度で、しかも、閾値を変更可能とするために、pluxプロモーターの両端にlacO配列を導入したpluxlacOプロモーターを考案し、AHL-LuxR複合体によるプロモーターへの結合をLacIリプレッサーによる立体障害により制限することとした。この改良Luxシステム(下図)では、培養開始時に異なる濃度のIPTGを添加することで、pluxlacOプロモーター活性およびその制御下にあるAHL合成の速度が変化するため、閾値菌体密度を自由に調整可能な菌体密度センサーとして機能すると期待された。



自律制御物質生産微生物の構築

で構築した、遺伝子トグルスイッチによるイソプロパノール生産大腸菌の生産量向上に関する研究では、IPTGの添加タイミングにより、菌体増殖およびイソプロパノール生産量が大きく異なる。これは、IPTG添加

が早いとTCAサイクルが培養初期で停止し、十分な菌体増殖が得られないために、イソプロパノールの生産量が低くなり、逆に、添加が遅いと、十分な菌体増殖は得られるものの、その後もTCAサイクルでアセチルCoAが消費されるため、イソプロパノールの生産量が低くなるためである。菌体が自らの菌体密度を感知し、適切なタイミングで遺伝子トグルスイッチを自ら制御し、生産量を最大化するような菌体を作成するため、で構築した遺伝子トグルスイッチに、で構築した改良Luxシステムを融合させた(下図)。



同じ領域内の計画研究、公募研究との共同研究

領域内の10以上のグループと議論をして、共同研究を進めた。特に、伊庭班が開発した解析ソフトで安定動作する振動回路をコンピュータに自動設計させ、我々が人工遺伝子回路を生体内に作成し、Rondelez班が作成した微小流体リアクターを利用して菌体の培養を行い、人工遺伝子回路の動作を内田班が作成した画像解析ソフトによって解析する研究を進めた。

4. 研究成果

安定動作する遺伝子トグルスイッチ

構築済みの遺伝子トグルスイッチを改良するため、時系列的に詳細な解析を行った。その結果、レポーターとして利用しているGFPmut3.1に、多量体形成による大腸菌への毒性が予想された。また、これを支持する報告もあったため、多量体形成に関するアミノ酸配列に変異を加えたyemGFPを利用したところ、10時間以上、遺伝子発現が維持されることがわかった。また、遺伝子トグルスイッチに関する基礎データを収集し、数理解析を行っている。

遺伝子トグルスイッチの応用研究

gltA破壊株に、gltAを導入した遺伝子トグルスイッチ組み込み、gltA制御株を作成したところ、この株はIPTG非存在下では野生株と同等の生育を示した。また、対数増殖期中期(培養開始後9h)にIPTGを添加したところ、速やかにクエン酸シンターゼ活性が低下し、最終的に野生株と比較して93%以上の活性の低下が認められた。この際、TCAサイクル前半の代謝物であるクエン酸およびα-ケトグルタル酸濃度は野生株と比較して96%以上低下し、細胞内のアセチルCoA濃度は3.2倍に向上した。このように、遺伝子トグルスイッチを用いることで菌体増殖に重要

な代謝経路を培養の任意のタイミングで遮断し、物質生産の起点となる目的の中間代謝物濃度を向上させることができた。

TCA サイクルの遮断により増加した細胞内アセチル CoA を実際の物質生産に利用するため、イソプロパノール生産合成代謝経路を *glcA* 制御株に導入した。この回路では、グルコースからアセチル CoA を経て TCA サイクルに流れる代謝物の流れ（代謝流束）を、IPTG 添加により、イソプロパノール生産合成代謝経路への代謝流束に転換することが可能となる。この株を代謝トグルスイッチ株とした。代謝トグルスイッチ株では、前述のように、IPTG 添加タイミングによって、菌体増殖およびイソプロパノール生産量が大きく異なると考えられたので、さまざまなタイミングで IPTG を添加し、イソプロパノール生産量を比較した（下表）。培養開始直後に IPTG を添加した場合は、著しい菌体増殖の低下が見られたものの、最終的なイソプロパノール生産量はコントロール株の 3.3 倍まで向上した。菌体増殖の低下を招かず、最適なタイミング（OD₆₀₀ ≈ 1.6）で TCA サイクルを停止した場合は、イソプロパノール生産量はコントロール株（大腸菌にイソプロパノール生産合成代謝経路を導入した株）の 3.7 倍、対グルコース収率は 3.1 倍まで向上した。このように、代謝トグルスイッチによる代謝流束制御は、十分な菌体密度を担保しながら中央代謝経路の余剰な代謝流束を物質生産に転用するために非常に有用な合成生物工学的ツールと考えられた。

誘導時間 (h)	誘導時菌体密度 (OD ₆₀₀)	IPA 生産量 (mM)	比増殖速度 (h ⁻¹)
0	0.1	45.7	0.07
6	0.5	48.3	0.21
9	1.6	50.9	0.20
12	3.6	38.1	0.22
15	5.3	20.5	0.23
コントロール株	0.5	13.7	0.21

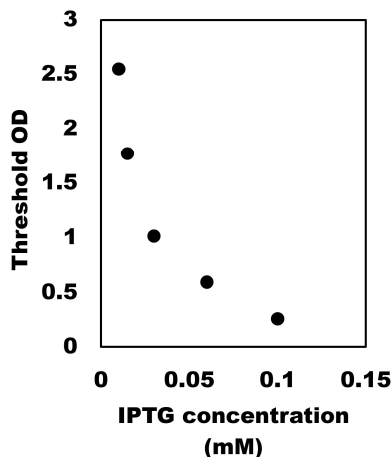
センサータンパク質の改良

シアノバクテリア由来の 2 成分制御系を大腸菌内に再構成し、光波長に反応して遺伝子発現制御（緑色で ON、赤色で OFF）を行う大腸菌を構築した。さらに、シアノバクテリアの光波長センサータンパク質 *CcaS* と大腸菌の嫌気センサータンパク質 *ArcB* とのキメラ（*ArcaS*）を作成し、大腸菌の嫌気応答レギュロンの発現を光で制御できることを示した。

クオラムセンシングの再構成と改良

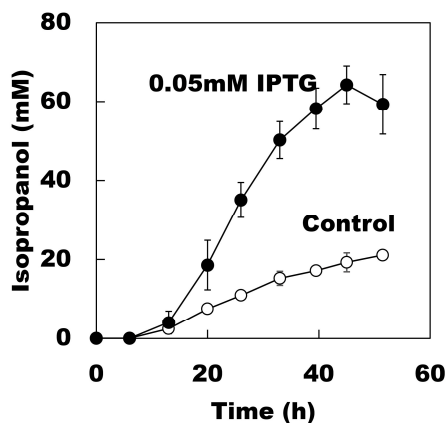
菌体密度を感知して、自律的な制御を行う大腸菌を構築するため、QS 機構の再構成と改良を行った。そのため、*plux* プロモーターの両端に *lacO* 配列を導入した *pluxlacO* プロモーターを構築し、レポーター遺伝子として *yemGFP* を用い、改良 *Lux* システムとした。培養開始時に添加する IPTG 濃度を変更し、

実験を行ったところ、IPTG 濃度依存的に、閾値菌体密度が変化することがわかった。また、低い IPTG 濃度では、物質生産で応用できるような高い菌体密度で遺伝子発現を誘導できることが明らかとなった。（下図）



自律制御物質生産微生物の構築

改良 *Lux* システムを遺伝子トグルスイッチの *pLacO1* 制御系と置換することで、任意の菌体密度で自律的に代謝流束制御を行うイソプロパノール生産大腸菌の構築に成功した。この自律制御物質生産微生物は、培養開始時に添加する IPTG 濃度に依存して、イソプロパノール生産量が大きく変化した。最適な IPTG 濃度（本研究では 0.05mM）では、十分な菌体密度に到達したことを自ら感知し、細胞内代謝を増殖に適した状態から生産に適した状態に代謝流束を自律的に制御した。その結果、IPTG の添加タイミングをマニュアルで最適化した代謝トグルスイッチ株とほぼ同等の生産量を達成した。（下図）



同じ領域内の計画研究、公募研究との共同研究

安定動作する振動回路をコンピュータに自動設計させる研究に関しては、現在までのところ、振動する菌体の作成には成功していないが、研究期間終了後も、各研究項目の改良を続ける。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 17 件)

Keigo Tsuruno, Hiroshi Honjo, Taizo Hanai, Enhancement of 3-hydroxypropionic acid production from glycerol by using a metabolic toggle switch, *Microbial Cell Factories*, 査読有, Vol. 14, 2015, 155,

DOI: 10.1186/s12934-015-0342-1

Yuki Soma, Taizo Hanai, Self-induced Metabolic State Switching by a Tunable Cell Density Sensor for Microbial Isopropanol Production, *Metabolic Engineering*, 査読有, Vol. 30, 2015, 7-15,

DOI: 10.1016/j.ymben.2015.04.005

Hiroshi Honjo, Keigo Tsuruno, Tsuneyuki Tatsuke, Masaki Sato, Taizo Hanai, Dual synthetic pathway for 3-hydroxypropionic acid production in engineered *Escherichia coli*, *J Biosci Bioeng.* 査読有, Vol. 120, 2015, 199-204,

DOI: 10.1016/j.jbiosc.2014.12.023

Yuki Soma, Keigo Tsuruno, Masaru Wada, Atsushi Yokota, Taizo Hanai, Metabolic flux redirection from a central metabolic pathway toward a synthetic pathway using a metabolic toggle switch, *Metabolic Engineering*, 査読有, Vol. 23, 2014, 175-184,

DOI: 10.1016/j.ymben.2014.02.008

Hiroyuki Hamada, Fumimasa Nomura, Tomoyuki Kaneko, Kenji Yasuda, and Masahiro Okamoto: Exploring the implicit interlayer regulatory mechanism between cells and tissue: Stochastic mathematical analyses of the spontaneous ordering in beating synchronization, *BioSystems*, 査読有, 111, 208-215, 2013,

DOI:

10.1016/j.biosystems.2013.02.007

この他 12 報の論文を発表しております。

〔学会発表〕(計 80 件)

岡駿佑、堀槇佑子、杉江よしみ、大塚北斗、饗場浩文、合成生物学の展開に向けた光応答性大腸菌の創成、第 38 回日本分子生物学会年会、2015 年 12 月 1 日-4 日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

Hiroyuki Hamada, Masahiro Okamoto, System analysis for the accessory gene regulator system of *Staphylococcus aureus*, International Symposium on Synthetic Systems Biology Joint 14th

Symposium of Biochemical Systems Theory, 2015.9.17-18, JR Hakata City AMU (福岡県・福岡市)

Taizo Hanai, Synthetic Genetic Circuit for Improvement of Iso-propanol Production, KMB2015, 2015 年 6 月 24 日~2015 年 6 月 26 日、慶州市(韓国)招待講演

この他、77 件の学会発表を行っております。

〔図書〕(計 2 件)

鶴野圭悟、花井泰三、シーエムシー出版、リサイクルバイオテクノロジー(バイオマスからの C3 アルコール生産)、2013、34-42

花井泰三、シーエムシー出版、合成生物学の隆起(合成代謝経路によるバイオアルコール生産)、2012、91-95

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 新規人工遺伝子回路

発明者: 花井泰三、相馬悠希、鶴野圭悟

権利者: 九州大学

種類: 特許

番号: 特願 2014-004659

出願年月日: 平成 26 年 1 月 14 日

国内外の別: 外国

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.syn-biol.com/>

<http://www.brs.kyushu-u.ac.jp/~taizo/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

花井 泰三(HANAI, Taizo)

九州大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号: 6 0 2 8 3 3 9 7

(2) 研究分担者

饗場 浩文(AIBA, Hirohumi)

名古屋大学・創薬科学研究科・教授

研究者番号: 6 0 2 1 1 6 8 7

濱田 浩幸(HAMADA, Hiroyuki)

九州大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号: 8 0 3 4 6 8 4 0

岡本 正宏(Okamoto, Masahiro)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号: 4 0 2 1 1 1 2 2